

15. Costanzo MR, Augustine S, Bourge R, et al. Selection and treatment of candidates for heart transplantation. A statement for health professionals from the Committee on Heart Failure and Cardiac Transplantation of the Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:3593-612.
16. Grady KL, Naftel DC, Costanzo MR, et al. Are preoperative obesity and cachexia risk factors for post heart transplant morbidity and mortality?: a multi-institutional study of preoperative weight-height indices. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18:750-63.
17. Rossano JW, Grenier MA, Dreyer WJ, et al. Effect of body mass index on outcome in pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2007;26:718-23.
18. Butler J, Howser R, Portner PM, et al. Body mass index and outcomes after left ventricular assist device placement. *Ann Thorac Surg* 2005;79:66-73.
19. Piccione W Jr. Left ventricular assist device implantation: short and long-term surgical complications. *J Heart Lung Transplant* 2000;19(suppl):S89-94.
20. Salzberg S, Lachat M, Zund G, et al. Left ventricular assist device as bridge to heart transplantation—lessons learned with the MicroMed DeBakey axial blood flow pump. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;24:113-8.
21. Rauchhaus M, Coats AJ, Anker SD. The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *Lancet* 2000;356:930-3.
22. Mustafa I, Leverve X. Metabolic and nutritional disorders in cardiac cachexia. *Nutrition* 2001;17:756-60.
23. Anker SD, Coats AJ. Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest* 1999; 115:836-47.
24. Weber MA, Neutel JM, Smith DH. Contrasting clinical properties and exercise responses in obese and lean hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2007;37:169-74.
25. Anker SD, Negassa A, Coats AJ, et al. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet* 2003;361:1077-83.
26. Oreopoulos A, Padwal R, Kalantar-Zadeh K, et al. Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. *Am Heart J* 2008;156:13-22.
27. Feldman A, Combes A, Wagner D, et al. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:537-44.
28. Van-Zee KJ, Kohno T, Fischer E, et al. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4845-9.
29. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Bulmer K, et al. Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Am J Physiol* 1999;277:E971-5.
30. Dostos CH, Doehner W, Rauchhaus M, et al. Body mass and survival in patients with chronic heart failure without cachexia: the importance of obesity. *J Card Fail* 2003;9:29-35.

## 《心筋症治療の現況，新しい試み》 心臓移植と待機患者への治療

中谷武嗣\*

### 要旨

- わが国における心臓移植例は少なく，待機期間は長期に及び，待機状況も全例が Status 1 で，補助人工心臓 (VAS) 装着率も高い，しかし，心臓移植後の成績は国際レジストリーと比較して良好である。
- VAS による長期補助が行われるようになり，4 年前後の補助後に心臓移植された症例もある。しかし，現在用いることができる VAS は，体外設置型の東洋紡製国立循環器病センター型のみである。今後，長期在宅療法が期待される植込み型左心補助人工心臓 (植込み型 LVAS) の早期臨床導入が望まれる。

### はじめに

心臓移植は，各種治療の限界となった重症心不全に対する治療選択として 1980 年代初頭より行われるようになり，これまでに世界では 7.4 万例以上に施行されてきた<sup>1)</sup>。わが国では 1997 年 10 月に「臓器の移植に関する法律」が制定され，1999 年 2 月に第 1 例目が行われてから，2009 年 1 月 15 日現在までに 62 例が施行された。また 2006 年 4 月からは，健康保険において，同種心移植術として移植関係学会合同委員会で心臓移植実施施設として選定された施設での実施が認められた。

### 心臓移植の適応

Table 1 に，わが国での適応基準を示す。主な適応疾患は，拡張型心筋症 (DCM) および拡張相肥大型心筋症 (dHCM) と虚血性心筋疾患で，DCM および dHCM においては心筋生検による確定診断が必須である。心臓移植後は一生にわたる免疫抑制療法が必要であることから，適応検討に際し，

移植以外の治療手段，予測される余命，治療に対するコンプライアンスなど，Table 1 の 2, 3. で示す適応条件と除外条件を慎重に検討する。

### 心臓移植の適応決定と待機

わが国における適応判定は，各施設内適応検討会に加え，日本循環器学会心臓移植適応検討小委員会の 2 段階審査で行うこととなっている<sup>2)</sup>。両者で心臓移植適応と判定されれば，各移植施設で本人および家族へのインフォームドコンセントが行われ，諸手続きを経て日本臓器移植ネットワークの心臓移植待機リストへ登録し，移植待機となる。

移植待機中の管理においては，いつドナー情報が出て移植できるように治療を続けることが重要である。また，待機中の心不全治療により心機能が改善し移植対象外となる場合や，あるいは感染や臓器障害などにより適応から外れる症例があるため，適宜検討が必要である。心不全により重要臓器の機能障害が高度になれば移植対象外となるため，臓器障害が進行する場合には，補助人工

\* T. Nakatani (部長)：国立循環器病センター臓器移植部 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)。

Table 1. 心臓移植におけるレシビエント適応基準

<p>1. 適応となる疾患 心臓移植の適応となる疾患は、従来の治療法では救命ないし延命の期待がもてない以下の重症心疾患とする</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 拡張型心筋症、および拡張相の肥大型心筋症</li> <li>2) 虚血性心筋疾患</li> <li>3) その他(日本循環器学会および日本小児循環器学会の心臓移植適応検討会で承認する心臓疾患)</li> </ol> <p>2. 適応条件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 不治の末期的状態にあり、以下のいずれかの条件を満たす場合             <ol style="list-style-type: none"> <li>a) 長期間または繰り返し入院治療を必要とする心不全</li> <li>b) <math>\beta</math>遮断薬および ACE 阻害薬を含む従来の治療法では、NYHA 3 度ないし 4 度から改善しない心不全</li> <li>c) 現存するいかなる治療法でも無効な致死的重症不整脈を有する症例</li> </ol> </li> <li>2) 年齢は 60 歳未満が望ましい</li> <li>3) 本人および家族の心臓移植に対する十分な理解と協力が得られること</li> </ol>	<p>3. 除外条件</p> <p>A) 絶対的除外条件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 肝臓、腎臓の不可逆的機能障害</li> <li>2) 活動性感染症(サイトメガロウイルス感染症を含む)</li> <li>3) 肺高血圧症(肺血管抵抗が血管拡張薬を使用しても 6 wood 単位以上)</li> <li>4) 薬物依存症(アルコール性心筋疾患を含む)</li> <li>5) 悪性腫瘍</li> <li>6) HIV (human immunodeficiency virus) 抗体陽性</li> </ol> <p>B) 相対的除外条件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 腎機能障害、肝機能障害</li> <li>2) 活動性消化性潰瘍</li> <li>3) インスリン依存性糖尿病</li> <li>4) 精神神経症(自分の病気、病態に対する不安を取り除く努力をしても、何ら改善がみられない場合に除外条件となることがある)</li> <li>5) 肺梗塞症の既往、肺血管閉塞病変</li> <li>6) 膠原病などの全身性疾患</li> </ol>
--	---

心臓 (ventricular assist system : VAS) による心臓移植へのつなぎ (bridge to transplant) を考慮する。現時点で用いることができる VAS は、体外設置型の東洋紡製国立循環器病センター型のみであるが、現在 1 種の拍動流型左心補助人工心臓 (left ventricular assist system : LVAS)、および、3 種の無拍動流ポンプを用いた植込み型 LVAS の健康保険での採用に向けて、治験などが進められている<sup>3)</sup>。

### 補助人工心臓の適応と管理

Table 2 に、心臓移植待機患者における補助人工心臓 (VAS) 適応基準を示すが、血行動態の指標に加え、重要臓器など全身状態への配慮が重要で、不可逆性の腎・肝障害、敗血症、中枢神経疾患、高度の出血傾向がある症例は除外される。また、VAS 適応後の補助期間が長期になるため、本人および家族へのインフォームド・コンセントが重要となる。

VAS 装着後は、循環動態とともに全身状態の改善を計る。早期の抜管、経口摂取開始、ライン抜

去を試み、感染の危険性を減少させる。また、早期よりリハビリテーションを開始し、全身状態に応じて、病室内歩行から、自転車こぎや病棟内歩行、あるいは心臓リハビリテーションなどへ進めていく。

VAS 装着患者の管理においては、血栓塞栓症と感染症に配慮が必要である。血栓塞栓症に対しては、外科的出血コントロール後から抗血栓療法を開始する。当初、heparin (あるいは低分子 heparin) を用い、経口摂取開始後は warfarin に変更する。目標 PT-INR は、東洋紡製 VAS では 3~4 前後に維持し、コントロールに難渋する場合は heparin (あるいは低分子 heparin) を併用する。また、術後早期から抗血小板療法を併用する。通常は aspirin (バイアスピリンあるいはバファリン 81 mg) を 1 錠/day 投与し、血小板機能に応じて投与量を調整する。抗血栓塞栓療法を行っている際の出血時における対応が重要で、脳出血では早期の対応が予後に影響する。筆者らは、乾燥人血液凝固第 IX 因子複合体を用いている。

感染症に対しては、予防が重要である。また補

Table 2. 慢性難治性重症心不全患者に対する補助人工心臓の適応基準

<p>1. 左心補助人工心臓                  内科的治療 および/あるいは IABP に反応しない心不全                  1) 血行動態                  PCWP<math>\geq</math>20 mmHg                  および                  収縮期血圧<math>\leq</math>80 mmHg あるいは 心係数<math>\leq</math>2.0                  2) 副徴                  1 時間排尿<math>\leq</math>0.5 ml/kg                  SvO<sub>2</sub><math>\leq</math>60%                  臨床経過                  急激な血行動態の変化                  進行する腎機能障害*                  進行する肝機能障害**</p>	<p>2. 右心補助人工心臓                  左心補助人工心臓駆動下において、一酸化窒素(NO)吸入を含む内科的治療、および三尖弁形成術(高度三尖弁逆流例)に反応しない右心不全                  CVP<math>&lt;</math>18 mmHg では、収縮期血圧<math>\leq</math>80 mmHg あるいは心係数<math>\leq</math>2.0                  3. 適応除外                  1) 回復不能な腎機能障害                  2) 回復不能な肝機能障害                  3) 呼吸不全(循環不全に伴うものは除く)                  4) 高度な血液障害(出血傾向など)                  5) 重症感染症                  6) インフォームドコンセントがとれない場合</p>
--	---

IABP: 大動脈内バルーンパンピング, PCWP: 肺動脈楔入圧, CVP: 中心静脈圧.

\* 進行する腎機能障害の指標: BUN $\geq$ 40 mg/dl および/あるいは クレアチニン $\geq$ 2 mg/dl, 1 時間排尿 $\leq$ 0.5 ml/kg(利尿薬の使用下).

\*\* 進行する肝機能障害の指標: 総ビリルビン $\geq$ 2.0 mg/dl および/あるいは SGOT $\geq$ 200 U/l.

助期間が長期になるに従い、精神状態が不安定になりやすく、精神神経科医を含めた医療チームによる対応が重要である。

### わが国における人工心臓の臨床応用○

2008 年度の日本臨床補助人工心臓研究会レジストリーによると、1,039 例に補助人工心臓(VAS)が適応され、主な使用ポンプは東洋紡製(62%)であった。1992 年より心筋症へも適応されるようになり、2006 年からは、東洋紡製 VAS の心臓移植へのブリッジ使用も健康保険で認められるようになった。

心筋症への適応は 394 例に達し、東洋紡製が 289 例ともっとも多く、植込み型は Novacor LVAS 27 例, HeartMate-IP LVAD 17 例, HeartMate-VE 7 例で、2005 年より、無拍動流型 LVAS のサンメディカル社製 EVAHEART が 18 例, Jarvik 2000 が 14 例, テルモ社製 DuraHeart が 6 例に用いられている。平均施行日数は 334(最長 1,496)日であった。移植例は 80 例(国内 50 例, 渡航 30 例)あり、50 例が心機能の改善を認めて離脱し、71 例が施行中であった。

Table 3. わが国における心臓移植希望者(レシピエント)選択基準: 医学的緊急度

<p>Status 1: 次の(ア)から(エ)までの状態のいずれかに該当すること                  (ア) 補助人工心臓を必要とする状態                  (イ) 大動脈内バルーンパンピング(IABP)を必要とする状態                  (ウ) 人工呼吸を必要とする状態                  (エ) ICU, CCU などの重症室に収容され、かつ、カテコラミンなどの強心薬の持続的な点滴投与が必要な状態</p>
<p>Status 2: 待機中の患者で、上記以外の状態</p>
<p>Status 3: Status 1, Status 2 で待機中、除外条件(感染症など)を有する状態のため一時的に待機リストから削除された状態</p>

### ドナー発生時の対応と心臓移植手術○

ドナー発生時、心臓移植のドナーとして適当と判断されれば、日本臓器移植ネットワーク登録中の待機リストからレシピエント候補が選定される。適合条件は、血液型の一致あるいは適合、サイズの適合(体重差-20~+30%が望ましい)、前感染抗体がないこと(リンパ球・クロスマッチを実施)がある。適合条件に合致する候補者が複数い

Table 4. 日本臓器移植ネットワークへの登録症例(2009年1月5日現在)

＜心臓移植＞	
登録待機中*	123例(Status 1: 65例)
移植	60例
取消し	12例
死亡	117例
海外渡航移植	35例
登録者累計	347例

\* 登録待機中には、心肺同時4例を含む。  
[文献6)より引用]

る場合は、虚血許容時間(4時間以内に血流再開ができること)、医学的緊急度、ABO式血液型および待機期間により優先順位を決定する。

医学的緊急度は、Table 3に示すように補助人工心臓(VAS)など循環呼吸補助を必要とする症例が、Status 1として優先される。血液型は一致が優先され、一致者がいなければ適合者に配分される。また、同一条件患者が複数の場合は、待機期間の長い者から優先される。

心臓移植手術は、いつ行われるか予測できないため、短時間で準備ができる体制が必要である。さらに、心臓は他の臓器よりも許容虚血時間が短いため、ドナーチームとレシピエントチームの緊密な関係が重要である。レシピエント手術においては、心房位吻合を行う Lower-Shumway 法と、

上・下大静脈で吻合する bicaval 法があり、当センターでは、レシピエントの右房後壁の一部を温存して上・下大静脈で吻合する modified bicaval 法を用いている<sup>4)</sup>。

心臓移植手術後は、移植心不全、急性拒絶反応、感染症、悪性腫瘍、冠動脈病変などに配慮した、一生継続管理が必要である<sup>5)</sup>。

### わが国における心臓移植の成績◎

2009年1月5日までに日本臓器移植ネットワークへ347人が登録され、60例(14%)の心臓移植が実施されたが、117人(35%)が待機中に死亡した(Table 4)<sup>6)</sup>。

その後、2例の心臓移植と1例の心肺同時移植が施行された。

2008年10月の日本心臓移植研究会レジストリーでは、年齢は8~61(平均38)歳で、男性35例、女性17例であった<sup>7)</sup>。原疾患は拡張型心筋症(DCM)および拡張相肥大型心筋症(dHCM)が55例で、ほかは虚血性心筋疾患3例、先天性心疾患1例で、国際レジストリーにおける虚血性および非虚血性心筋症がほぼ同数である状況とは、大きく異なっている<sup>1)</sup>。待機状態は全例Status 1で、50例(85%)は左心補助人工心臓(LVAS)装着例であった。移植待機日数は長期化し、現在ではStatus 1として平均777日で、1年以上の待機は

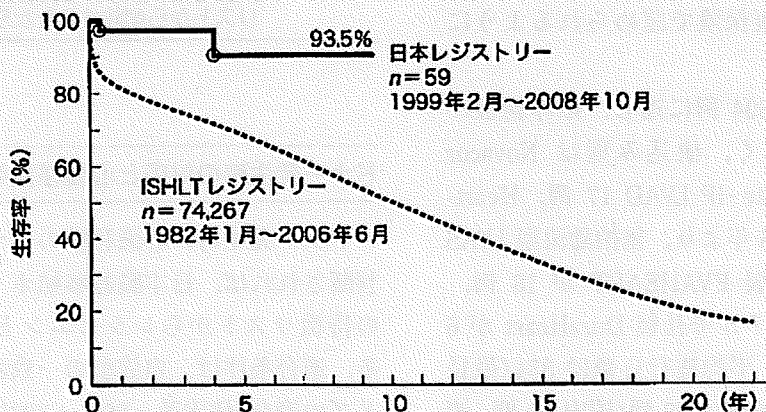


Fig. 1. 世界および日本における心臓移植の累積生存率  
[文献7)より引用]

51例(86%)に及んでいる。LVAS装着期間も長期化し、平均780日で、43例(86%)が1年以上の待機であった。東洋紡製LVAS(左室脱血型)がもっとも多く、最長例は1,496日に及んでいる。

これまでに2例が死亡したが、9年以上経過例が3例あり、国際レジストリーに比べ良好な成績を示している(Fig.1)<sup>7)</sup>。また、日常生活にてとくに生活制限を認めておらず、良好なQOLを示している。

### 今後の展望○

わが国は、心臓移植施行例は少なく、待機期間が長期に及び、全例がStatus 1と重症例で、左心補助人工心臓(LVAS)装着例も多い。しかし、移植後の成績は良好である。今後、重症心不全に対する治療選択として、心臓移植プログラムの充実が望まれるとともに、長期在宅療法が期待される植込み型LVASの早期臨床導入を図ることが重要で

あると考える。

### 文 献○

- 1) Taylor DO et al: Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult heart transplant report - 2008. J Heart Lung Transplant 27: 943, 2008
- 2) 藤原久義, 西垣和彦: なぜ内科医は移植医療にかかわらないか? 心臓移植の立場から: わが国は信じがたい心臓移植後進国. 移植 41: 2, 2006
- 3) 中谷武嗣: 補助循環・人工心臓. 内科学, 第9版, 杉本恒明, 矢崎義雄(編), 朝倉書店, 東京, p205-209, 2007
- 4) Kitamura S et al: Modification of bicaval anastomosis technique for orthotopic heart transplantation. Ann Thorac Surg 72: 1405, 2001
- 5) 中谷武嗣ほか: 移植医療: 機械的循環補助も含めて. 循環器 62(1): 67, 2007
- 6) 日本臓器移植ネットワーク HP. <<http://www.jotnw.or.jp/>>
- 7) 日本心臓移植研究会: 本邦心臓移植登録報告(2008年). 移植 43: 470, 2008



## 乳房超音波診断ガイドライン (改訂第2版)

編集◆日本乳癌甲状腺超音波診断会

A4判・156頁 2008.5. ISBN978-4-524-24364-8 定価3,360円(本体3,200円+税5%)

乳癌の診断に欠くことのできない乳房超音波検査法の用語、検査法、判定方法の標準化を目的に、日本乳癌甲状腺超音波診断会がまとめた診断ガイドライン。技術的側面も画像管理を策定し、超音波検診のあり方や成果も掲載。今改訂では、画像を一新したほか、病理、インターベンション、検診などの記述も充実させた。日本乳癌学会ほか推薦。



II. 各種データ・実績

2. 成績 (移植症例登録事業から)

心臓

中谷武嗣

国立循環器病センター臓器移植部

II. 各種データ・実績

はじめに

日本心臓移植研究会において行った本邦における心臓移植例成績について報告する<sup>1)</sup>。

対象および結果

本邦において2009年6月末までに施行された心臓移植症例に関し、以下の検討を行った。

1. 心臓移植症例数

1997年10月から2009年6月30日までに376名が日本臓器移植ネットワークへ心臓移植希望登録を行い、うち本邦で心臓移植が64名に、また心肺移植が1例に実施された。この間に37名の海外渡航移植があり、14名は取り消し、121名が待機中に死亡した。6月30日現在の登録者数は139名(うち3名は心肺移植希望)であるが、医学的緊急度はStatus 1が76名(55%)、Status 2が55名(40%)、Status 3が8名(6%)である。

1999年2月に臓器移植法下第1例が行われ、本年6月までに64例施行された。図1に年次別施行症例数を示す。施行数は増加傾向を示し、2006年以降年間10例に達している。

心臓移植実施施設は、国立循環器病センター、大阪大学、東京女子医科大学の3施設で開始され、その後、

東京大学、埼玉医科大学、東北大学、九州大学が認定された。これまでの施行数は、国立循環器病センター：26例、大阪大学：18例、東京大学：8例、東京女子医科大学：4例、埼玉医科大学3例、九州大学：3例、東北大学：2例である。なお、現在は埼玉医科大学を除く6施設が心臓移植実施施設である。また、2001年5月からは拡張型心筋症(DCM)および拡張相肥大型心筋症(dHCM)に対する心臓移植手術が高度先進医療として承認され、2006年4月からは健康保険において同種心移植術として心臓移植実施施設として選定された施設での実施が認められた。

2. 施行患者

年齢は8~61(平均37.7)歳で、性別は男性45例、女性19例であった。図2に年齢別分布を示すが、40歳代が最も多かった。原因疾患は、拡張型心筋症(2次性含む)および拡張相肥大型心筋症が60例と大多数を占め、虚血性心筋症は3例と少数で、他は先天性心疾患1例であった。

3. 待機状況

施行全例がStatus 1にて待機中であった。Status 1での待機期間は29~1,390(平均787)日で、その待機期間の分布を図3に示すが、2~3年の待機患者が

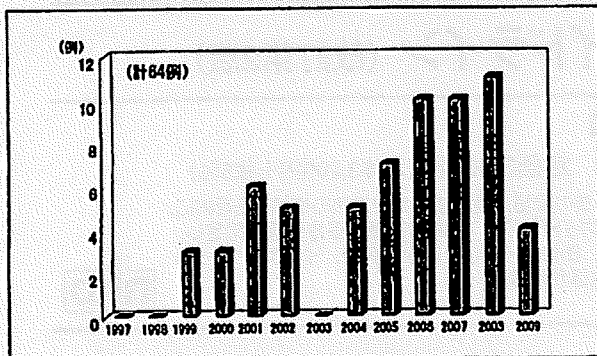


図1 本邦における心臓移植の年次推移

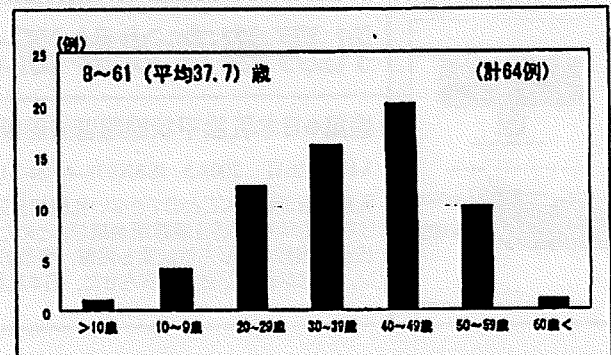


図2 本邦における心臓移植施行例の年齢別分布

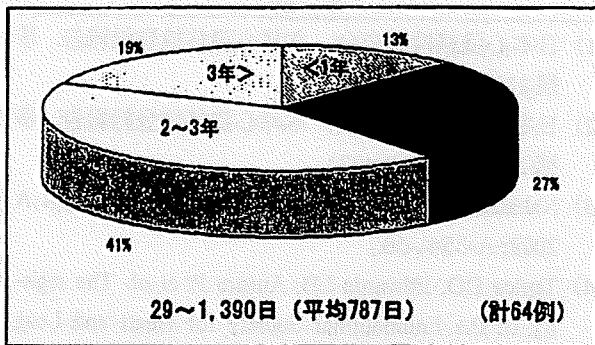


図3 本邦における心臓移植施行例の Status 1 での待機期間

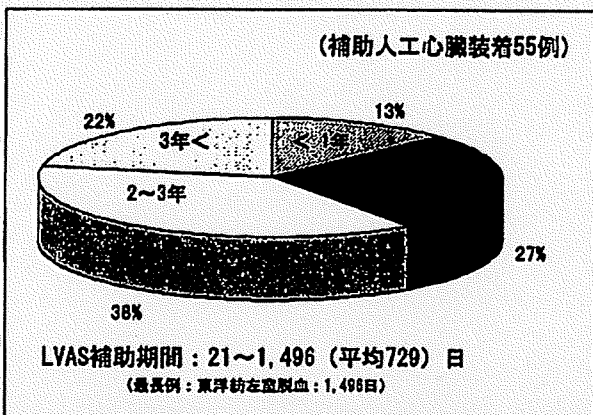


図4 本邦における心臓移植施行例の補助人工心臓の補助期間

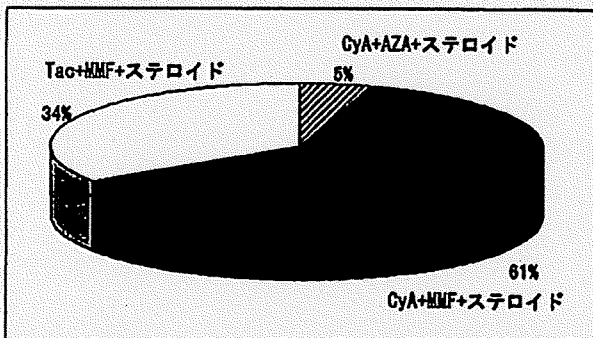


図5 本邦における心臓移植施行例の初期免疫抑制療法  
CyA: シクロスポリン, Tac: タクロリムス, MMF: セルセプト

最も多く、3年以上の待機が12例(18%)であった。また、総待機日数は29~2,715(平均884)日であった。

Status 1 の状況は、強心剤が9例(14%)で、他の55例は左心補助人工心臓(LVAS)によるブリッジ例であった。用いられたLVASは、東洋紡製LVAS 39

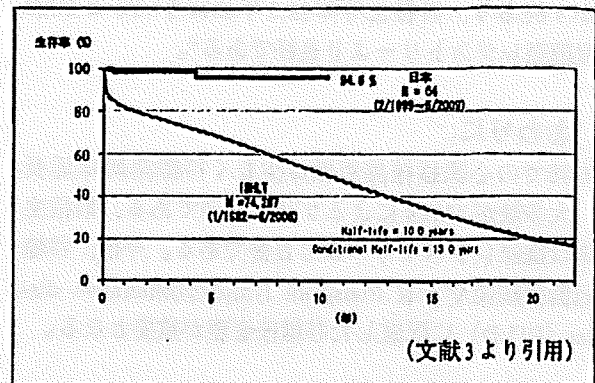


図6 世界および本邦における心臓移植の累積生存率

例(うち左室脱血型37例)、植込み型16例(Novacor: 6例, HeartMateIP: 3例, HweartMateVE: 2例, Jarvik 2000: 2例, EvaHeart: 3例)であった。

LVASによる補助期間は21~1,496(平均729)日で、3年以上補助例が12例(22%)あり、最長例は東洋紡製左室脱血方式によるもので4年に及んだ(図4)。

#### 4. 心筋保護液および移植手術

心筋保護液は、Modified Collins液(9例)、St. Thomas液(7例)、Bredshnieder液(3例)、およびUW液(3例)が用いられてきたが、最近では主にCelsior液(42例)が用いられている。

術式は、Lower-Shumway法(16例)、Bicaval法(3例)、Modified-Bicaval法(44例)で、先天性心疾患の1例にはtotal heart法が用いられた。なお、1例では同時に大動脈弁置換術が行われた。

#### 5. 免疫抑制療法

初期免疫抑制療法として、全例カリシニューリンインヒビターとしてシクロスポリン(CyA)あるいはタクロリムス(Tac)を用いる3者併用療法が用いられ、最近ではTacを用いる例が増加している(図5)。代謝拮抗剤としてミコフェノール酸モフェチル(MMF)が主に使用されている。

また、Induction therapyは19例(OKT3: 8例, ATG: 3例, Simulect: 8例)で行われてきた。なお2008年以降ではSimulectのみが用いられた。

#### 6. レシピエントの生存率

図6に本邦の累積生存率を示すが、死亡例は2例のみで、死因は肺炎(4カ月後死亡例)および感染症(4年2カ月後死亡例)であった。10年を越える生存



例が3例あり、累積生存率は5年以降94.6%と2008年度国際レジストリーより良好である。

#### おわりに

本邦での心臓移植施行数は少なく待機期間は延長し、大多数がLVASによるブリッジ例である、累積生存率は国際レジストリーより良好である。今後、移植後冠動脈病変や post transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) に配慮した移植後管理が重要となる。

#### 文献

- 1) 日本心臓移植研究会. 本邦心臓移植登録報告. 移植 2007; 42: 427-429.
- 2) 日本心臓移植研究会. 本邦心臓移植登録報告. 移植 2008; 43: 470-473.
- 3) Nakatani T. Heart transplantation. Circ J Suppl A 2009; A-55-A-60.
- 4) Taylor DO, Edwards LB, Aurora P, *et al.* The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twentieth-fifth official adult heart transplant report-2008. J Heart Lung Transplant 2008; 27: 943-956.

# わが国における心臓移植での エベロリムスの現状

中谷武嗣・薬瀬正伸・村田欣洋・瀬口 理・加藤倫子<sup>\*1)</sup>，戸田宏一・  
藤田知之<sup>\*2)</sup>，和田恭一・中野一也<sup>\*3)</sup>

## シンポジウム

CPCF 2009

### Present status of everolimus in Japan

Takeshi Nakatani・Masanobu Yanase・  
Yoshihiro Murata・Osamu Seguchi・Tomoko Kato<sup>\*1)</sup>，  
Koichi Toda・Tomoyuki Fujita<sup>\*2)</sup>，  
Kyoichi Wada・Kazuya Nakano<sup>\*3)</sup>

key words : 心臓移植, エベロリムス, mTOR 阻害薬,  
シクロスポリン, タクロリムス

近年、心臓移植後の管理において、急性拒絶反応や感染症に加え、慢性期の移植心冠動脈病変 (cardiac allograft vasculopathy : CAV)、移植後リンパ球増殖症 (PTLD)、腎機能障害などが注目されるようになった。新たに開発された mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害薬 エベロリムス (商品名：サーティカン) は、T 細胞、B 細胞および血管平滑筋細胞の増殖を G1 期で阻害する機能があり、CAV や PTLD の予防あるいは治療の可能性が示唆され、また、カルシニューリン阻害薬 (CNI) であるシクロスポリン (CyA、商品名：ネオオーラル) やタクロリムス (TAC、商品名：プログラフ) を減量することによる腎機能の改善が期待される。

このエベロリムスは、1993 年 3 月にスイスで非臨床試験が開始され、ヨーロッパで臨床試験が行われ、心臓および腎移植後の拒絶反応抑制に対し 2003 年にスウェーデンで承認され、04 年 3 月にはドイツで発売が開始された。エベロリムスの心

臓移植への使用に関するコンセンサス会議が 2003 年に開催され、その結果が 05 年に発表され<sup>1)</sup>、広く用いられるようになった。その後、2006 年に第 2 回の会議が開催され<sup>2)</sup>、さらに 08 年には mTOR 阻害薬としてのラパマイシンおよびエベロリムスに対する臨床ガイドラインが発表された<sup>3)</sup>。

わが国では、臓器移植法による心臓移植が行われるようになり、エベロリムスの有用性が日本心臓移植研究会を中心に検討され、2004 年 3 月に同研究会から国内導入の要望書を厚生労働省に提出した。その後、2005 年 6 月にはノバルティスファーマ社が海外データのみで承認申請を行い、審査が進められ、07 年 1 月に“心臓移植における拒絶反応の抑制”を適応として承認され、同年 4 月に保険収載された。

今回、わが国でのエベロリムスの現状について、筆者らの経験とともに報告する。

### わが国におけるエベロリムスの使用状況

これまでにわが国でエベロリムスが用いられた心臓移植例は 44 例 (男性 29 例、女性 15 例) で、開始時年齢は 2~63 歳 (平均 31 歳) と各年齢層に用いられている。これまで *de novo* での使用例はなく、冠動脈内膜肥厚 (22 例)、腎機能障害 (14 例)、PTLD (6 例) などの理由によりエベロリムスが用いられた。

有害事象としては、サイトメガロウイルス (CMV) 感染 2 例を含む感染 (6 例)、口内炎 (3 例)、腎機能障害 (1 例)、高脂血症 (1 例)、嘔気 (1 例)、

<sup>\*1)</sup>Department of Organ Transplantation, <sup>\*2)</sup>Department of Cardiovascular Surgery, <sup>\*3)</sup>Department of Pharmacy, National Cardiovascular Center 国立循環器病センター <sup>\*1)</sup>臓器移植部, <sup>\*2)</sup>心臓血管外科, <sup>\*3)</sup>薬剤部

表1 国立循環器病センターにおける MMF からエベロリムスへの変更例

	Patients No.					
	1	2	3	4	5	6
Age	23	20	43	39	52	41
Gender	Male	Female	Male	Male	Male	Female
Disease	DCM	DCM	dHCM	DCM	dHCM	Secondary CM
Indication of conversion	CAV	CAV	CAV Renal dysfunction Erythema nodosum	CAV Renal dysfunction Gum hyperplasia	CAV High titer of EBVPCR High risk of malignancy	CAV High risk of malignancy
Timing post Tx	1,319 d	1,123 d	2,458 d	2,330 d	1,609 d	1,433 d
CNI	TAC	TAC	TAC	CyA	CyA	TAC
Adverse events	Stomatitis (recurrent)	Tendency of low WBC	Stomatitis (early phase)	Stomatitis Arthritis → (Reconversion to MMF)	AMR	Difficulty of adjustment of dose → Restart of MMF (temporary)

DCM: 拡張型心筋症. dHCM: 拡張相肥大型心筋症. Secondary CM: 二次性心筋症(本症例は薬剤性). AMR: 抗体関連型拒絶反応

皮下膿瘍(1例), 発熱(1例)が報告されている。

また, CyA 使用 11 例においては, エベロリムス開始前の CyA のトラフ値が平均 150.8 ng/mL であったのが, 開始 3 カ月後には 106.9 ng/mL まで有意に減少した. TAC 使用では, 4.7 ng/mL から 4.0 ng/mL に減少した。

### 国立循環器病センターにおけるエベロリムスの使用例

#### (1) 症例および変更理由

当センターでは表 1 に示すように, 移植後 3 年以上を経過した 6 例(国内心臓移植 2 例, 渡航心臓移植 4 例)においてミコフェノール酸モフェチル(MMF)からエベロリムスへの変更を行った<sup>4)</sup>. その変更理由は, 冠動脈内膜肥厚 6 例, 腎機能障害 2 例, PTLD のハイリスク 2 例, 結節性紅斑 1 例, 歯肉肥厚 1 例であった(複数の理由によるものを含む). また, 併用する CNI は, TAC 4 例, CyA 2 例であった。

#### (2) 変更方法

エベロリムスへの変更は, TAC 使用例では

MMF を中止してエベロリムスに変更し, 変更 1 日目と 4 日目にトラフ値を確認, 7 日目に血中濃度曲線下面積(AUC), を測定し, その後 TAC を減量した(図 1). 2 週目は 2 回トラフ値を測定し, エベロリムスのトラフ値が目標の 5~8 ng/mL になるように投与量を調整した. TAC の目標トラフ値は 5~7 ng/mL とし, エベロリムスのトラフ値との合計は 10ng/mL 以上を目指す。

CyA 使用例では, MMF を中止してエベロリムスに変更し, 変更 4 日目から CyA の目標値を  $C_0$ ,  $C_2$ , および  $AUC_{0-4}$  が当初より 25% 低値となるように調整した(図 2)。

#### (3) 各症例の変更における所見(表 1)

症例 1 は, MMF が  $AUC_{0-12}$  より十分な治療域にあるにもかかわらず冠動脈内膜肥厚を認めたため, エベロリムスへ変更した. 当初口内炎が著明であったが, 経過とともに軽快した. 内膜肥厚の著明な進展は認めていない。

症例 2 は, 冠動脈内膜肥厚を認め, MMF は経過中に白血球減少を伴ったことより増量が困難であったため, エベロリムスに変更した. 変更前か

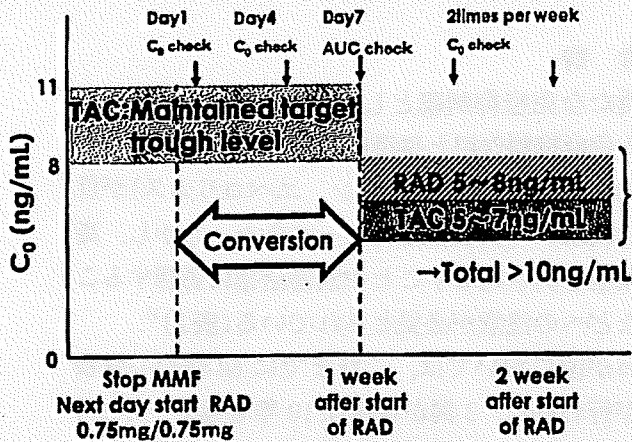


図1 タクロリムス使用例における MMF からエベロリムス (RAD) への変更法

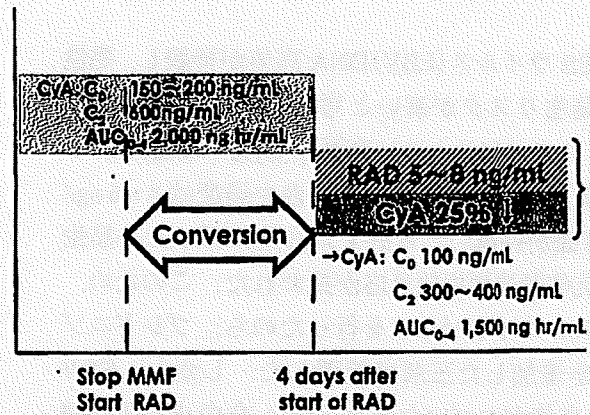


図2 シクロスポリン使用例における MMF からエベロリムス (RAD) への変更法

表2 エベロリムスの使用における患者選択

1. 新規の心臓移植患者  
すすめられる患者

- ・多くの新規患者
- ・CAVの危険性がある患者
- ・免疫リスクの高い(PRA上昇例)患者
- ・EBウイルス感染あるいはCMV感染の危険がある患者
- ・冠動脈病変のあるドナー心により移植された患者
- ・悪性腫瘍がある患者
- ・悪性腫瘍があった患者
- ・CAVによる再移植患者

すすめられない患者

- ・移植前にコントロール不良な高脂血症がある患者
- ・大きな再建を伴うあるいは繰り返す手術を受けている患者
- ・先天性心疾患を伴う患者
- ・両心補助人工心臓補助を受けている患者

2. 維持免疫療法を行っている心臓移植患者  
すすめられる患者

- ・CNIによる腎機能障害でCNIの減量を行う患者
- ・CAVを有する患者
- ・拒絶反応を繰り返す患者
- ・ステロイド抵抗性の拒絶反応を示す患者
- ・移植後の悪性腫瘍がある患者
- ・他の免疫抑制療法が行えない患者

すすめられない患者

- ・コントロール不良な高脂血症がある患者
- ・蛋白尿が800 mg/日以上

(Zuckermann A et al. : J Heart Lung Transplant 27 : 141-149, 2008<sup>9)</sup>より作成)

らの軽度の口内炎と白血球減少傾向を認めたが、エベロリムスのトラフ値を5 ng/mL前後とすることで安定し、拒絶反応はなく冠動脈内膜肥厚の進展も認めていない。

症例3は、冠動脈内膜肥厚、腎機能障害に結節性紅斑を認めたため、エベロリムスに変更した。エベロリムスの投与量は1.5 mg/日であったが、トラフ値は8 ng/mL前後と高値であり、当初口内炎を認めたがその後軽快した。結節性紅斑はエベロリムス変更後早期に消失した。拒絶反応はなく、冠動脈内膜肥厚の進展は認めていない。

症例4は、冠動脈内膜肥厚に加え腎機能障害および著明な歯肉肥厚を認めたため、エベロリムスに変更した。変更後口内炎を認めたが対応可能であった。しかし、膝関節炎が高度で膝をほとんど曲げられず、日常生活に支障をきたす状態となったため、MMFに戻さざるをえなかった。エベロリムス投与中にCyAの投与量を減量したため、腎機能の改善を認めた。MMFに戻した際、CyAの目標トラフ値をもとに戻したが、腎機能は維持されている。

症例5は、冠動脈内膜肥厚の進行を認めるとと

もにEBウイルス(EBV)DNA高値が持続し、悪性腫瘍発生リスクが高いと考えられた。そこで、MMFをエベロリムスに変更しCyAの減量を行った。変更当初エベロリムスの血中濃度は4~6 ng/mL前後が持続し、変更1カ月後に行った心筋生検で抗体関連型拒絶反応が疑われた。このため、経口ステロイドパルスを行ったのち、プレドニゾロンを追加した三剤で管理した。しかし、EBV DNA高値がつづいたため、CyAを中止し入院精査を行った。心筋生検では細胞性および抗体関連型拒絶反応を認めず、冠動脈病変の進展を認めなかった。また、諸検査にて悪性腫瘍は確認されず、EBV DNA値の減少を認めている。なお、本症例は手に蝮咬傷を受け、減張切開を行った。傷の治療に時間を要したが、特に大きな問題はなく経過している。

症例6は、症例5と同様に冠動脈内膜肥厚の進行にEBV DNA高値が持続したため、エベロリムスへ変更した。しかし、本症例ではカルバマゼピンが投与されており、エベロリムスの投与量を通常量より大幅に増加してもトラフ値は3~4 ng/mLと低値のままであったため、プレドニゾロンの併用投与を行った。エベロリムスの投与量が多いため一時的にMMFも併用したが、心筋生検で拒絶反応を認めず、また冠動脈内膜肥厚の進展も認めなかったため、MMFは中止した。

#### (4) 効果および副作用

エベロリムスへ変更後、冠動脈内膜肥厚の著明な進展は認めなかった。腎機能障害で用いた症例では、CNIを減量しえたことで腎機能の改善を認めた。また、MMF投与中に認めた治療抵抗性の結節性紅斑がエベロリムスに変更することで消失した。副作用としては、口内炎を3例に、白血球減少傾向を1例に、変更初期に抗体関連型拒絶反応を1例に認めた。また、口内炎の1例では、著明な関節炎も認めMMFへの再変更を必要とした。6例中5例はエベロリムスを続行中であり、PTLDのハイリスクの1例ではエベロリムスとプレドニゾロンの二剤併用に変更して加療中である。

#### 考 察

新たな免疫抑制薬としてCNIの減量を可能とする免疫抑制作用と平滑筋増殖抑制作用を有するmTOR阻害薬(ラパマイシン、エベロリムス)が積極的に用いられるようになってきた。しかし、高脂血症を引き起こすことや創傷治癒に影響することなどへの注意が必要とされている(表2)<sup>3)</sup>。

わが国においては、これまでに64例の心臓移植が行われた。3例が移植後10年を越え、死亡例は2例のみで10年生存率は94.6%である<sup>3)</sup>。しかし、待機期間は長期に及び、86%は左心補助人工心臓(LVAS)によるブリッジ例で、その多くは皮膚貫通部の感染症を伴っており、創傷治癒の面で当初からのエベロリムスの使用は検討を要する。ヨーロッパにおいても当初LVAS装着例はエベロリムスの使用を避けていたが、最近では安定したLVAS例では当初から用いるようになってきている。しかし、補助期間の差など検討すべきであり、LVAS例での新規からの使用に関しては今後の課題である。

また、移植後の管理が長期に及ぶようになり、腎機能障害、CAV、悪性腫瘍への配慮が必要となってきた。当センターでの国内心臓移植26例においても、冠動脈造影にて有意狭窄を認めるのはドナー持込みの1例のみであるが、多くは血管内超音波(IVUS)にて病変を認めている。長期例の管理において問題となる腎機能障害、CAV、悪性腫瘍に対し、筆者らの経験からもエベロリムスを用いることで対応が可能になると考えられる。

エベロリムスの治療効果についてさらに検討していくことが重要であるが、今後エベロリムスを用いた免疫抑制療法が広く用いられるようになると思われる。

#### 文 献

- 1) Hummel M: Recommendations for use of Certican®(everolimus) after heart transplantation: Results from a German and Austrian consensus conference. J Heart Lung Transplant 24: S196-S200, 2005.
- 2) Rothenburger M, Zuckermann A, Bara C et al.: Recommendations for the use of everolimus (Certican) in heart transplantation: Results from the second German-Austrian

Certican consensus conference. J Heart Lung Transplant 26 : 305-311, 2007.

- 3) Zuckermann A, Manito N, Epailly E et al. : Multidisciplinary insights on clinical guidance for the use of proliferation signal inhibitors in heart transplantation. J Heart Lung Transplant 27 : 141-149, 2008.

- 4) 中谷武嗣, 布田伸一, 福嶋教偉 : Discussion : 心移植におけるサーティカンの使用経験. 今日の移植 21 : 519-535, 2008.

- 5) Nakatani T : Heart transplantation. Circ J 73 (Suppl) : A55-A60, 2009.

## 討 論

**布田** フロアから質問を受けたいと思います。

**渡井** MMFからエベロリムスへの変更の際、変更前のMMF投与量はどれくらいでしたか。

加えて、エベロリムスの投与量は、併用するCNIの種類によって違いがあったのでしょうか。たとえば、CyAと併用する際には、体重や体表面積当たりの投与量がTACとの併用と比較して少なくすんだといったような傾向はみられましたか。

**中谷** MMFに関しては、 $AUC_{0-12}$ で39.25ng hr/mL以上に維持するように投与量を設定しています。このため、MMFの投与量は1gの人もいますし3gの人もいます。ただ、白血球減少などで投与量をそこまで上げることができない人もいるのが現状です。

TACとCyAの投与量については、最初に投与量を設定し、両者の血中濃度をみて、投与量を変更しています。

**渡井** ご発表では、エベロリムス投与下でも高脂血症例が1例と、頻度が低いように感じましたがいかがでしょうか。

**中谷** 提示しました症例では1例だけ高脂血症を認めましたが、この症例はもともと冠動脈病変もありますので、脂質のコントロールをするようにしています。

**布田** 中谷先生のご印象として、MMFからエベロリムスに変えると、トータル的に副作用は少なくなっていると感じられますか。

**中谷** 当初は、口内炎や関節炎もあったので、少し使いづらいという感じは持ちました。最初に変更した4例中1例は、結局MMFにリコンバートしたのですが、その後の3例をみていると、同じ投与量でも口内炎がほとんどなくなってきました。患者さんも初期の段階を過ぎてからは、変更したことでの差異をあまり感じなくなってきました。

症例によって違ってもいえますが、エベロリムスへの変更が妥当と考えられる患者さんには積極的に使っていきたいと思っています。

**布田** 私の経験では、もともと下痢を起こしやすい人は、エベロリムスに変更しても下痢を起こしやすいという印象があります。また、エベロリムスに変更して風邪を引く頻度が減ってきたことに、患者さんは喜ばれています。

**中谷** 風邪に関して、そういう印象は特に持っていないませんが、下痢に関しては、少なくとも結節性紅斑があった患者さんではエベロリムスに変更することで、MMF使用中は軟便であったのが変更後は普通便になって調子がいいと話されています。

現在、冠動脈内膜肥厚の下痢の人で切り替えを行っており、注意深く経過をみているところです。

**布田** 来年は心臓以外の臓器でも、エベロリムスの使用が進んでいると思われます。それを期待して、シンポジウムを終わりたいと思います。ありがとうございました。

### 発行者

布田 伸一 (東京女子医科大学東医療センター内科) (司会)

渡井 至彦 (名古屋第二赤十字病院移植外科)

中谷 武嗣 (国立循環器病センター臓器移植部)

# Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo (Lactic Acid) Conjugates

Sachiro Kakinoki<sup>1,2</sup>, Sho Uchida<sup>1,3</sup>, Tomo Ehashi<sup>1,2</sup>, Akira Murakami<sup>3</sup>, and Tetsuji Yamaoka<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, <sup>2</sup>JST, CREST, 5 Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan, <sup>3</sup>Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan.  
e-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

*A novel method for surface modification of PLA scaffold based on amphiphilic conjugates composed of oligo lactic acid (OLA) and bioactive peptide was designed and developed. PLA thin-films modified with the amphiphilic OLA-AG73 conjugates were prepared by spin-coating. Cell adhesion and neurite outgrowth of PC12 cells on the modified thin-films were greatly improved.*

**Keywords:** AG73, nerve regeneration, PLA, scaffolds, surface modification

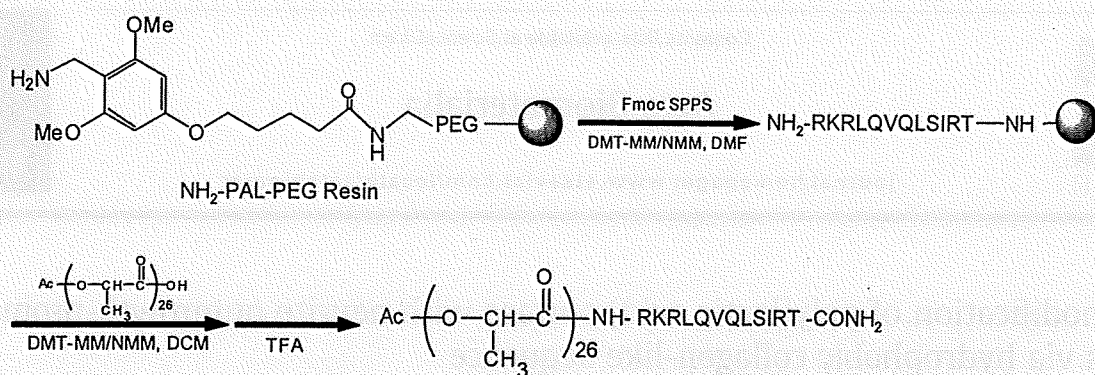
## Introduction

Tissue engineering has been proposed as an approach to create tissues and organs by use of various scaffolds as a temporary extra-cellular matrix. Poly (lactic acid) (PLA) is a preferred biodegradable material since it is non-enzymatically hydrolyzed to low-toxic lactic acid *in vivo* and has high mechanical properties and excellent shaping and molding properties.

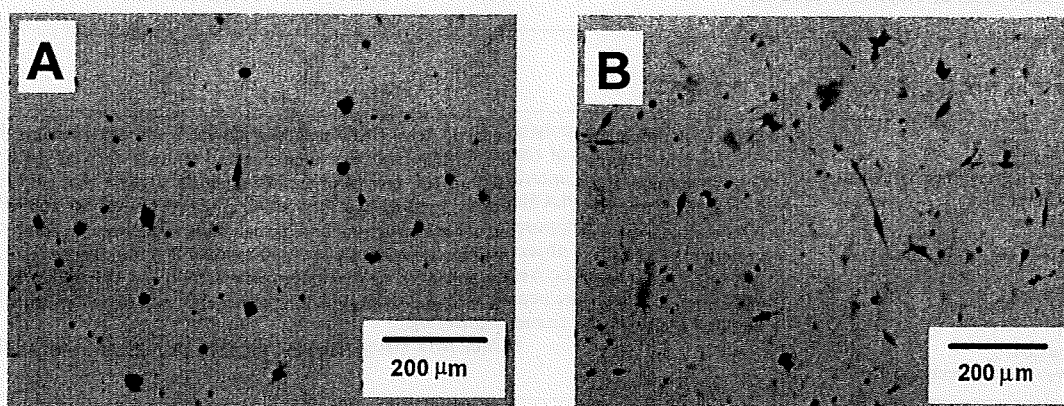
On the other hand, PLA has no specific bioactivities and then is preferred to be modified with bioactive molecules. A variety of bioactive peptides has been reported to be useful for tissue regeneration so far. For example, RGD sequence isolated from fibronectin is well known to support cell adhesion. Various modification techniques for PLA which has no functional groups have been proposed [1] but they are quite hard to apply to the nano-structured PLA scaffold since they are very fragile. In this report, we developed amphiphilic conjugates composed of bioactive peptides and oligo (lactic acid) (OLA) to functionalize nano-structured PLA scaffolds and evaluate their bioactivities.

## Results and Discussion

Bioactive sequence, RKRLQVQLSIRT (AG73) [2], which has been reported to accelerate the neurite outgrowth *in vitro* was selected. OLA whose hydroxyl group end is capped with acetyl group was synthesized by condensation reaction. The OLA-AG73 conjugates were synthesized by Fmoc solid phase procedure (Scheme 1).



*Scheme 1. Synthesis of Ac-OLA26-AG73.*



*Figure 1. Neurite outgrowth of PC12 cells on PLA (A) and PLA/OLA-AG73 (B) thin-films.*

Three weight % of OLA-AG73 conjugates were added to 10 weight % of PLA solution in hexafluoro isopropanol, and the mixed solutions were spin coated onto cover glass ( $\phi$  14 mm) or electro spun to aluminum foil, resulting in surface modified thin-films and nano-fiber sheets respectively. As is shown in Figure 1, the cell adhesion and neurite outgrowth of PC12 cells on PLA/OLA-AG73 thin-film were improved and reached to longitudinal and transversal respectively. These behaviors must be resulted from AG73 peptides immobilized on thin-film surface but other factors may also affect it. The physicochemical characteristics should be changed even when only 3 % of OLA-AG73 was added. In addition, the surface density of OLA-AG73 on thin-film and its releasing profiles should be analyzed in detail.

In general nano-structured PLA scaffolds are much more difficult to be modified than the bulk materials because they are very weak and fragile against to mechanical stress, chemical reaction, and thermal treatment. The newly developed OLA-Peptide conjugates were found to be very powerful tool for modifying such ultra thin-films or nano-fibers just by adding only 3 % to the dope before processing.

#### References

1. Fujiwara T., Mukose T., Yamaoka, T., Yamane H., Sakurai S., Kimura Y. (2001) *Macromol. Biosci.*, **1**, 204-208.
2. Weeks B. S., Nomizu M., Ramachandran R.S., Yamada Y., Kleinman H. K. (1998) *Exp. Cell Res.*, **243**, 375-382.





Contents lists available at ScienceDirect

Acta Biomaterialia

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actabiomat](http://www.elsevier.com/locate/actabiomat)

## Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence

Sachiro Kakinoki, Tetsuji Yamaoka\*

Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan  
 JST, CREST, 5 Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 July 2009

Received in revised form 11 November 2009

Accepted 1 December 2009

Available online xxx

## Keywords:

Surface modification

PLA scaffold

Peptide adsorption

Hydrophobic interaction

Neurite outgrowth-promoting peptide

## ABSTRACT

Surface modification of poly( $\alpha$ -lactic acid) (PLA) scaffolds has been performed using a bifunctional small peptide composed of collagen-like repetitive sequence and laminin-derived sequence (AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>) via hydrophobic interaction. The results of surface analysis suggest that AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> can be stably adsorbed onto PLA films via hydrophobic interaction at the (PPG)<sub>5</sub> region, and form an extracellular matrix-like layer composed of both structural and biosignalling sequences. In addition, neurite outgrowth of PC12 cells was observed on the AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed PLA film. These results indicate that AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> very effectively enhances neurite outgrowth activity on PLA films. The hydrophobic adsorption of collagen-like peptide bound to biosignalling molecules may be widely applied as a surface modifier of PLA films for tissue engineering.

© 2009 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Tissue engineering has been proposed as an approach to replace damaged, injured or missing tissue with biologically compatible substrate combining cells or biosignalling molecules and scaffolds [1,2]. Scaffolds assume the role of a temporary extracellular matrix (ECM) where biodegradability and biocompatibility are essential for tissue regeneration. Furthermore, biodegradable scaffolds should be designed not to obstruct tissue regeneration via cell-induced natural healing. The cellular responses to the scaffold surfaces determine whether tissue regeneration will be promoted or obstructed. Therefore, it is very important to control the biological property of the scaffold surfaces [3].

Poly(lactic acid) (PLA) is widely used for biodegradable scaffolds as it possesses a number of suitable characteristics for this role. PLA can be hydrolytically degraded into lactic acid; this degradation requires only water, and the final product can immediately be metabolized in vivo [4]. Moreover, PLA material exhibits excellent shaping and molding properties because of its mechanical versatility. However, insufficient interaction between PLA materials and cells leading to in vivo foreign-body reactions is a major problem because the required biological activities are not inherent in PLA. PLA lacks functional groups and so cannot be easily modified

with bioactive molecules. Therefore, many investigators have attempted to impart functional groups to PLA in order to enhance its biological activity by using copolymerization or chemical grafting with other polymers [5], plasma treatment [6], chemical modification [7] and physical adsorption. In previous studies, we reported on the preparation of poly(lactic-co-malic acid)-conjugated Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptide [8] and gelatin-immobilized PLA scaffold [9] in order to improve the cell attachment. However, because these techniques are prone to adverse chemical reactions, it is necessary to develop techniques that are simpler and offer better biocompatibility. Physical adsorption, which is driven by electrostatic, hydrophobic and specific interactions, has been noted as a simpler surface modification technique of PLA scaffolds [10–12].

In the current work, neurite outgrowth-promoting peptides, consisting of laminin-derived sequence and collagen-like sequence, were designed as surface modifiers of PLA films via hydrophobic adsorption. PLA is preferred as a base material for a nerve regeneration conduit because of its excellent shaping and molding properties [13]. However, PLA does not inherently cater to any nerve regeneration activity. If biologically modified PLA-based artificial nerve can promote nerve regeneration, it might be possible to avoid donor site defects in autologous nerve transplantation. It was reported that laminin-derived sequence AG73 supports neurite outgrowth [14], and therefore was selected as a nerve-regenerating peptide.

On the other hand, it is well known that collagen is a predominant component of ECM [15,16]. The major part of collagen

\* Corresponding author. Address: Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan. Tel.: +81 6 6833 5012x2637; fax: +81 6 6835 5476.

E-mail address: [yamtet@ri.ncvc.go.jp](mailto:yamtet@ri.ncvc.go.jp) (T. Yamaoka).

consists of Xaa-Yaa-Gly repetitive sequences, where Xaa and Yaa positions are often occupied by Pro and 4(R)-hydroxyproline (Hyp), respectively, and forms the hydrophobic polyproline-II (PP-II) structure [17–20]. The collagen triple-helix structure is composed of three PP-II chains, and collagen-like peptides (CLPs) such as (Pro-Pro-Gly)<sub>n</sub> are also able to form a triple-helix structure [21–23]; therefore, CLP is expected to be adsorbed by PLA films via hydrophobic interaction. Animal-derived collagen has also been intensively investigated as a conduit for nerve regeneration because of its high bioactivity [24]. However, animal-derived collagens possess high antigenicity *in vivo* because of the unnecessary biosignal sequences and enzymatically digested fragments [25]. CLP, which is the repetitive sequence at a structural region of collagen without any enzyme-digestible sequence, is anticipated to be of low immunogenicity.

Here, we are reporting on a neurite outgrowth-promoting peptide composed of AG73 and CLP (AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>) as a surface modifier of PLA films for tissue engineering. Conformation of AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> was studied by circular dichroism (CD) spectroscopy. The surface characteristics of AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed PLA film were investigated by water contact angle measurement and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). PC12 cells were primed with nerve growth factor (NGF) and cultured on the AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed PLA films, and the neurite outgrowth activity was then quantified.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

(PPG)<sub>10</sub>, AG73 (RKRLQVQLSIRT) and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> were commercially synthesized by SCRUM, Inc. (Tokyo, Japan). PLA (MW 130,000) was obtained from Mitsui Chemicals, Inc. (Tokyo, Japan). Progesterone, sodium selenite (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) and transferrin were purchased from Nacal Tesque, Inc. (Kyoto, Japan). NGF and horse serum (HS) were obtained from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Insulin, advanced DMEM/F12 and penicillin-streptomycin were purchased from Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from MP Biomedicals, Inc. (Solon, OH, USA).

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Circular dichroism

CD spectra were measured by a J-720 spectropolarimeter (Jasco Co., Tokyo, Japan) with a standard analysis program. The temperature was controlled using a recirculating waterbath and spectra was recorded with a 0.1 cm path length cell, using a scanning speed 10 nm min<sup>-1</sup>, with a 1.0 nm spectral bandwidth, over the wavelength range from 190 to 250 nm. Peptides were dissolved with water at 0.25 mM. Data are represented in molar ellipticities ([θ] deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>).

#### 2.2.2. Peptide adsorption on PLA films

PLA films (diameter φ = 6.0 mm; t = 0.5 mm) were prepared with a hot shrinking machine at 180 °C and sterilized by UV irradiation. Three peptides, (PPG)<sub>10</sub>, AG73, and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>, were dissolved in sterilized water at 10 μM, and then 1 ml of each peptide solution was poured onto a PLA film in a 24-well cell culture plate. Peptide solutions were dried for 24 h. In order to get rid of any excessively adsorbed peptide, the PLA films were washed with 1 ml of sterilized H<sub>2</sub>O or 1.0 M NaCl aqueous solution twice for 30 min, and then the films were washed with 1 ml of sterilized H<sub>2</sub>O again and dried *in vacuo*.

#### 2.2.3. Water contact angle

The contact angle with distilled water was measured by using a contact-angle meter (CA-X; Kyowa Interface Science Co., Ltd., Saitama, Japan). Images of the water spreading on the sample were recorded by a camera and then analyzed. Three samples were measured for each group.

#### 2.2.4. X-ray photoelectron spectroscopy

The surface composition of peptide-adsorbed PLA films was determined using an ESCA-3400 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). The X-ray source was a monochromatic Mg K<sub>α</sub> X-ray from a rotating anode. Survey scans were measured from 0 to 1200 eV. Peak positions and areas were analyzed and ratios for C1s, N1s and O1s were calculated by using software provided by the manufacturer.

### 2.3. Cell culture

Rat adrenal pheochromocytoma PC12 cells (RIKEN BioResource Center, Ibaraki, Japan) were maintained in DMEM supplemented with 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin, 100 μg ml<sup>-1</sup> streptomycin, 10% FBS and 7.5% HS. PC12 cells were cultured in poly-D-Lys coated cell-culture dishes (BD, NJ, USA) and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

### 2.4. Neurite outgrowth assay

The neurite outgrowth assay was performed by using PC12 cells as the model of neural stem cells [26]. PC12 cells were primed with 100 ng ml<sup>-1</sup> NGF for 24 h on polystyrene cell-culture dishes. The cells were then collected by agitation and placed in the culture medium for 30 min at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. The cells were washed and resuspended with advanced DMEM/F12 containing 5 μg ml<sup>-1</sup> insulin, 100 ng ml<sup>-1</sup> NGF, 20 nM progesterone, 30 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and 100 mg ml<sup>-1</sup> transferrin. The cells were then seeded on peptide-adsorbed PLA films at a seeding density of 2.0 × 10<sup>4</sup> cells film<sup>-1</sup> in 24-well cell culture plates, and incubated at 37 °C for 24 h. PC12 cells on peptide-adsorbed PLA films were fixed with 10% formalin and stained by 4% crystal violet/methanol solution, and then the number of PC cells with or without neurites was determined in order to evaluate the neurite outgrowth activity as described elsewhere [27,28]. The lengths of neurites were measured using software (Image J; National Institute of Mental Health, MD, USA) [29]. Cells with neurites longer than 50 μm and those with neurites shorter than 50 μm were counted separately.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Secondary structure of peptides

The CD spectra of (PPG)<sub>10</sub>, AG73 and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> are shown in Fig. 1. The CD spectrum of (PPG)<sub>10</sub> in water at 37 °C exhibited a strong negative band at 209 nm and a positive band at 229 nm, which are known as typical patterns of collagen triple-helix and PP-II structure [20,30]. Although the CD spectrum of PP-II is similar to that of collagen triple-helix, the transition temperature of (PPG)<sub>10</sub> is reported to be about 28 °C in water [31]. Therefore, this CD spectrum indicates that (PPG)<sub>10</sub> forms the PP-II structure. The CD spectrum of AG73 showed a strong negative band at 199 nm, assigned as a random-coil structure. In the case of AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>, the CD spectrum indicated an intermediate pattern between (PPG)<sub>10</sub> and AG73. This means that a negative band was blue-shifted and a positive band at 229 nm was decreased in comparison with (PPG)<sub>10</sub>. In addition, all CD spectra have an isosbestic

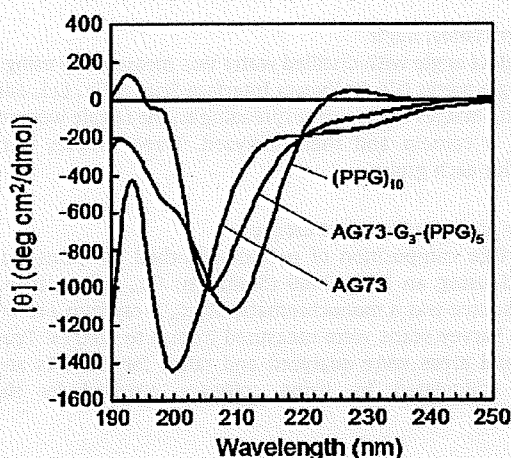


Fig. 1. Circular dichroism spectra of (PPG)<sub>10</sub>, AG73 and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> in water.

point at 220 nm. The results suggest that the CLP region of AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> also forms the PP-II structure. It is well known that the PP-II structure is the predominant secondary structure in collagen triple-helix. In addition, the PP-II structure of (PPG)<sub>n</sub> repetitive sequence exposes hydrophobic five-membered rings of Pro residues. Therefore, it is inferred that (PPG)<sub>n</sub> is adsorbed onto PLA films via hydrophobic interaction.

### 3.2. Surface characterization of peptide-adsorbed PLA films

To compare the hydrophilicity of the peptide-adsorbed PLA film surfaces, the water contact angle was measured (Table 1). The water contact angle of non-adsorbed PLA films was 79.1 ± 1.2°, which indicates a hydrophobic surface. After adsorption of (PPG)<sub>10</sub>, AG73 and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>, the water contact angle changed to 70.1 ± 3.9°, 31.2 ± 2.1° and 55.6 ± 1.9°, respectively. The water contact angle drastically decreased with AG73 and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> adsorption, but with (PPG)<sub>10</sub> adsorption the decrease was considerably less. It seems that the surface wettability of peptide-adsorbed PLA films corresponded to the hydrophilicity of the peptides, i.e. (PPG)<sub>10</sub> is more hydrophobic than AG73 and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>. Safinia et al. reported that the PLA film surface shows a negative ζ-potential at physiological pH [32] because of a carboxyl group at the terminal of the PLA molecule. Therefore, the results suggest that these peptides are adsorbed onto PLA film via hydrophobic or electrostatic interactions.

The XPS N1s spectrum is shown in Fig. 2. The XPS spectra of (PPG)<sub>10</sub>, AG73- and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed PLA films exhibited a N1s peak corresponding to amino acids. In order to compare the adsorbed peptide ratio on PLA films, the elemental ratios are summarized in Table 2. N1s was not detected clearly because PLA itself does not contain nitrogen. The N1s/C1s ratios were 0.07, 0.09 and 0.18, and the N1s/O1s ratios were 0.03, 0.04 and 0.09. The N1s/C1s and N1s/O1s ratios were increased with peptide adsorption; in particular, the highest values were shown for AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>. The AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> might be adsorbed at high density via hydro-

Table 1  
Water contact angle of peptide-adsorbed PLA films.

	CA (°)
Non-adsorbed	79.1 ± 1.2
(PPG) <sub>10</sub>	70.1 ± 3.9
AG73	31.2 ± 2.1
AG73-G <sub>3</sub> -(PPG) <sub>5</sub>	55.6 ± 1.9

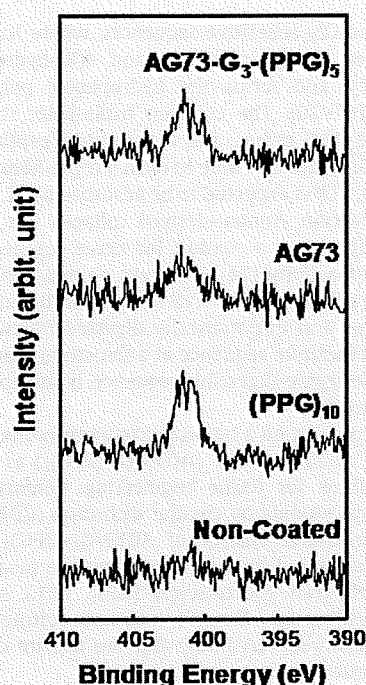


Fig. 2. XPS spectra of the N1s region of peptide-adsorbed PLA films.

Table 2  
Elemental ratio of nitrogen to carbon (N1s/C1s) or oxygen (N1s/O1s) measured by XPS.

	PLA	(PPG) <sub>10</sub>	AG73	AG73-G <sub>3</sub> -(PPG) <sub>5</sub>
N1s/C1s	0.01	0.07	0.09	0.18
N1s/O1s	0.00	0.03	0.04	0.09

phobic interaction between (PPG)<sub>5</sub> region and PLA. The reason for the decrease in water contact angle of AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed PLA film (Table 1) is that the hydrophilic AG73 region in AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> was partially exposed to solution. Ji et al. also indicated that the poly(ethylene oxide-propylene oxide-ethylene oxide) amphiphilic triblock copolymer bearing RGD tripeptides adsorbed onto PLA films through hydrophobic interaction, and its hydrophilic regions were exposed to solution phase [11]. As a result, the AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> adsorbs via hydrophobic interaction and constructs an ECM-like layer on the PLA film surface.

### 3.3. Neurite outgrowth activity of peptide-adsorbed PLA films

The morphology of PC12 cells on peptide-adsorbed PLA films is shown in Fig. 3a, and the number of adhered PC12 cells with or without neurites is summarized in Fig. 3b. On the naked and (PPG)<sub>10</sub>-adsorbed PLA films, PC12 cells (~230 cells mm<sup>-2</sup>) did not adhere well enough, and so neurite outgrowth could not be found. This indicates that (PPG)<sub>n</sub> itself does not support bioactivity for cell adhesion or neurite outgrowth. Meanwhile, on AG73- and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed PLA films, the adhesion of PC12 cells was improved to more than 300 cells mm<sup>-2</sup>. Neurite outgrowth also occurred, i.e. the number of PC12 cells with neurites was more than 75% on both AG73- and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed PLA films. In contrast, the mechanisms of adsorption of these films must be different from each other since the physicochemical properties of AG73 and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> are quite dissimilar. As mentioned above, they are considered to be adsorbed onto PLA films via

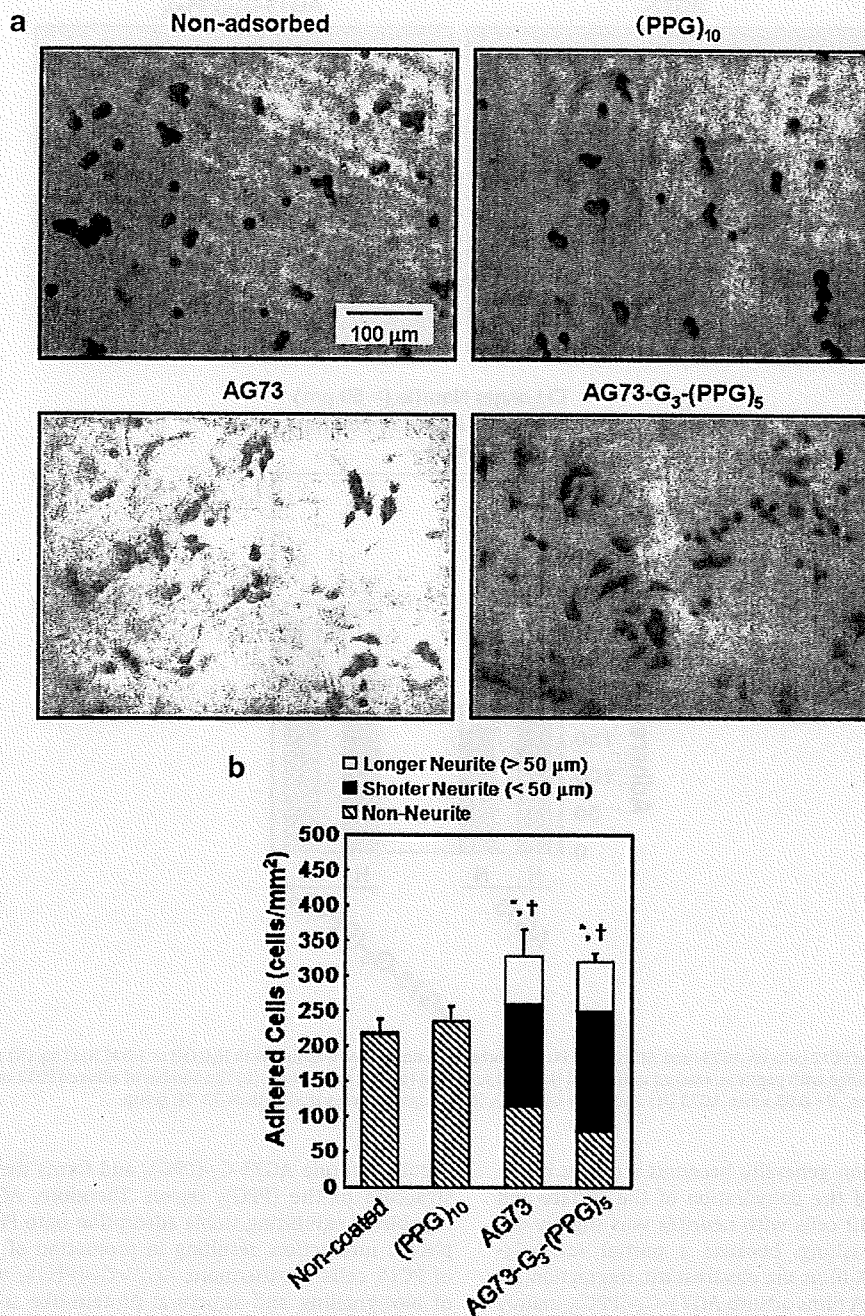


Fig. 3. Neurite outgrowth activity of PC12 cells on peptide-adsorbed PLA films. (a) Morphology of PC12 cells on peptide-adsorbed PLA films after 24 h. (b) The number of adhered PC12 cells on peptide-adsorbed PLA films with and without neurites.  $P < 0.05$  when AG73 and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> groups compared with non-coated group;  $^{\dagger}P < 0.05$  when AG73 and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> groups compared with (PPG)<sub>10</sub> group.

electrostatic and hydrophobic interactions, respectively. It is anticipated that under physiological conditions, adsorption of AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> is more stable than that of AG73.

In order to evaluate the stability of the adsorbed AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>, neurite outgrowth assay was performed on AG73 and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed PLA films after washing with 1.0 M NaCl aqueous solution (Fig. 4). In the case of AG73-adsorbed PLA films, the number of adhered PC12 cells is decreased to below 60% by 1.0 M NaCl washing, but the ratio of PC12 cells with neurites remains unchanged. After 1.0 M NaCl washing, the water contact angles of (PPG)<sub>10</sub>-, AG73- and AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed PLA films

changed from  $70.1 \pm 3.9^\circ$ ,  $31.2 \pm 2.1^\circ$  and  $55.6 \pm 1.9^\circ$  to  $70.3 \pm 1.5^\circ$ ,  $60.0 \pm 1.3^\circ$  and  $54.6 \pm 4.2^\circ$ , respectively. That is, the water contact angle of the AG73-adsorbed PLA films was drastically increased by 1.0 M NaCl washing, but that of AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed films was changed a little. These results indicated that adsorbed AG73 seemed to be partially removed by 1.0 M NaCl washing, and the remaining AG73 expressed neurite outgrowth-promoting activity, because AG73 was mainly adsorbed via electrostatic interaction. Meanwhile, the number of adhered PC12 cells was not changed and neurite outgrowth was also found on AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>-adsorbed PLA films after washing with H<sub>2</sub>O or 1.0 M